

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

Departamento de Toxicología

**EFFECTOS DE LAS ISOFLAVONAS
GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA EN JUVENILES
DE *Solea senegalensis***

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Ambientales

Autora: Vanessa Aranda Quirós

Tutoras: Juana M^a Arellano López

M^a Gemma Albendín García

Puerto Real, 9 de febrero de 2018

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. EI LENGUADO SENEGALÉS (<i>Solea senegalensis</i>).....	3
1.2. ENZIMAS COLINESTERASAS.....	5
1.3. ISOFLAVONAS	8
1.3.1. GENISTEÍNA	8
1.3.2. DAIDZEÍNA	9
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	10
CAPÍTULO 3: ANTECEDENTES	11
CAPÍTULO 4: MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
4.1. MATERIAL BIOLÓGICOS.....	12
4.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD	13
4.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	15
4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA	16
4.5. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	18
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	18
CAPÍTULO 5: RESULTADOS.....	19
5.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD CON GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA	19
5.2. EFECTO DE LA GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA SOBRE LA ACETILCOLINESTERASA PRESENTE EN LA CABEZA DE <i>Solea senegalensis</i>	19
CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN	21
CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES	23
CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA.....	24
ANEXO	30

RESUMEN

Actualmente las enzimas colinesterasas se utilizan como biomarcadores, para determinar y evaluar los efectos producidos en los organismos, tras su exposición a agentes contaminantes. La isoflavonas, genisteína y daidzeína, son compuestos flavonoides que se encuentran principalmente en la familia de las leguminosas, sobre todo en la soja y sus productos derivados. Debido al gran crecimiento que ha experimentado el sector de la acuicultura en las últimas décadas, se ha creado la necesidad de encontrar nuevos y más económicos piensos para alimentar a los peces. Estos nuevos piensos incluyen en su composición la harina de soja, siendo de interés conocer los efectos que produce en los peces, la ingestión de altas concentraciones de genisteína y daidzeína. Por ello, el presente Trabajo de Fin de Grado, tuvo como objetivo estudiar los posibles efectos que producen dichas isoflavonas en juveniles de *Solea senegalensis*. Se realizaron dos ensayos de toxicidad aguda, uno utilizando genisteína y el otro con daidzeína. Dichos ensayos tuvieron una duración de 96 horas, realizándose en condiciones controladas de aireación constante y renovación del agua cada 24 horas. Transcurridas las 96 horas de ambos ensayos, se midió la actividad acetilcolinesterasa presente en las cabezas de lenguados. Los resultados obtenidos mostraron que ni la genisteína ni la daidzeína causaron la inhibición de la actividad enzimática acetilcolinesterasa.

ABSTRACT

Nowadays, cholinesterase enzymes are used as biomarkers to determine and evaluate the effects produced in organisms after exposure to contaminating agents. Isoflavones, genistein and daidzein, are flavonoid compounds found mainly in the legume family, especially in soybeans and their derived products. Due to the great growth that the aquaculture sector has experienced in recent decades, the need to find new and inexpensive feed to feed the fish has been created. These new feeds include soy flour in their composition, being of interest to know the effects produced in fish, the ingestion of high concentrations of genistein and daidzein. For this reason, the present Final Degree Project aimed to study the possible effects produced by these isoflavones in juveniles of *Solea senegalensis*. Two acute toxicity trials were performed, one using genistein and the other with daidzein. These tests lasted 96 hours, taking place under controlled conditions of constant aeration and renewal of water every 24 hours. After 96 hours in both tests, the

acetylcholinesterase activity present in the sole heads was measured. The results showed that neither genistein nor daidzein caused the inhibition of the enzymatic activity acetylcholinesterase.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. EL LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis*)

El lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), es un teleósteo perteneciente a la familia *Soleidae* y orden *Pleuronectiformes*. Esta especie de peces (Figura 1. A) se caracteriza por tener un cuerpo aplanado, ovalado y asimétrico debido a que aunque estos peces nacen con simetría bilateral, la van perdiendo a medida que se van desarrollando. En los ejemplares adultos los ojos están situados en el costado superior (normalmente en el lado derecho de la cabeza) y presentan el costado visual pigmentado en tonos marrones y el costado ciego sin pigmentar (Rodríguez y Peleteiro, 2014). Esta característica de su tonalidad les permite mimetizarse con los fondos arenosos y fangosos donde habita. Las aletas dorsal y anal se prologan desde la cabeza hasta la cola, donde se unen a la caudal mediante una membrana, quedando así todo su perímetro corporal rodeado por ellas. La aleta pectoral situada al lado del ojo, presenta una característica membrana irradial de color negro que permite diferenciar a los ejemplares de *Solea senegalensis* de los de *Solea solea* (lenguado común). Sus ojos son pequeños y asimétricos. La boca es de tamaño pequeño y forma redondeada encontrándose desplazada hacia la derecha en la mayoría de los individuos. Es una especie depredadora que basa su alimentación en pequeños peces, larvas de poliquetos, moluscos bivalvos y crustáceos que encuentra en los fondos marinos (FAO, 2017). Los ejemplares adultos presentan un tamaño medio de 45 cm de longitud (Sanches, 1991 en Torres y Ueberschaer 2017), pudiendo alcanzar los 60 cm (Desouter, 1990 en Torres y Ueberschaer 2017). Su peso oscila entre 1 y 3 kg (MAPAMA, 2017).

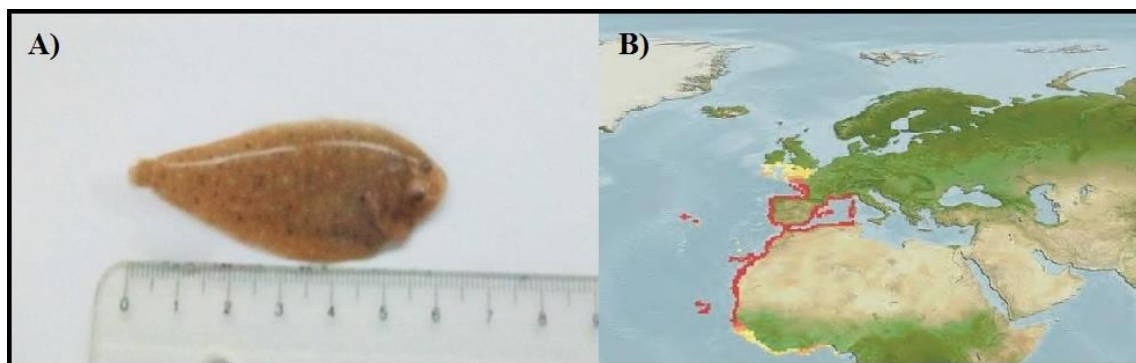


Figura 1: A) Ejemplar juvenil de *Solea senegalensis* (Kaup,1858) (Aranda, 2017). B) Mapa de distribución de *Solea senegalensis*, donde el rojo indica mayor presencia y el amarillo menor presencia (Fernández y Rodríguez, 2003 en Rodríguez y Peleteiro, 2014).

La forma de vida de estos peces es bentónica y marina. Su actividad es principalmente nocturna, pasando las horas diurnas enterrado en arena en la que puede alcanzar hasta los 100 metros de profundidad. La localización de esta especie se sitúa principalmente en el Océano Atlántico Oriental, desplazándose hacia el sur desde Francia hasta Angola (Figura 1. B). También se encuentra en menor proporción en el Mediterráneo Occidental, desde el Estrecho de Gibraltar hasta Cerdeña (Rodríguez y Peleteiro, 2014).

El ciclo biológico del lenguado senegalés comienza con la maduración sexual de los individuos alrededor de los 3-4 años de vida y al alcanzar los 30 cm de longitud. No hay diformismo sexual, pero las hembras suelen presentar mayor tamaño y peso que los machos. El desove se produce en zonas costeras, principalmente entre los meses de marzo y junio, cuando la temperatura se encuentra entre los 13°C y los 23°C (Dinis, 1986). Como se ha mencionado anteriormente, cuando las larvas nacen son pelágicas y bilateralmente simétricas. Es durante su crecimiento cuando se produce la metamorfosis y los peces adquieren las características físicas de su estado adulto, pasando a ser bentónicos y asimétricos (Figura 2). La metamorfosis produce importantes cambios morfológicos, fisiológicos y en la forma de vida del lenguado. Durante este proceso, se produce la migración ocular, remodelación craneofacial, recalibración de la visión y cambios en los patrones de pigmentación de la piel, tracto digestivo y alimentación (Klaren, Wunderink, Yúfera, Mancera, y Flik, 2008)

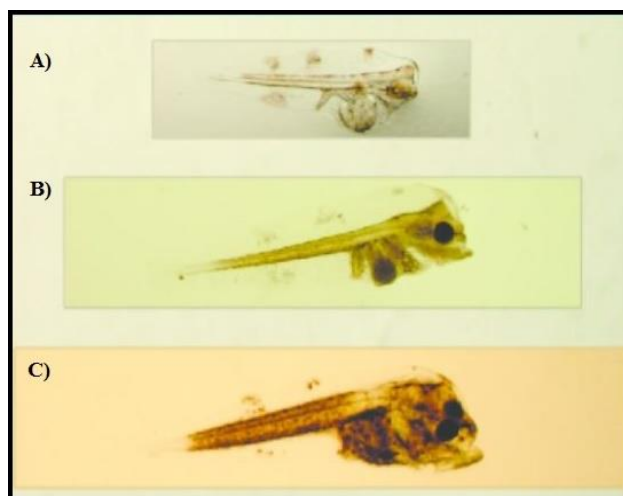


Figura 2: Evolución morfológica del lenguado. A) Larva recién eclosionada. B) Estadío intermedio. C) Inicio de la metamorfosis en la que ya se aprecia la migración ocular (Cañavate, 2013).

El lenguado senegalés está considerado en la actualidad como una de las especies más interesantes y prometedoras en acuicultura, debido a su rápido crecimiento y desarrollo larvario. Pese a que aún se encuentran limitaciones en el cultivo de esta especie, como la necesidad de controlar y evitar la aparición de ciertas patologías durante el engorde, los avances tecnológicos y el conocimiento que se tiene de ella, hacen posible que se produzcan individuos del tamaño comercial en un tiempo aproximado de un año (Cañavate, 2005). Su consumo se ha ido extendiendo progresivamente por toda Europa, provocando un aumento de la demanda de mercado de lenguado senegalés. Por este motivo, y por la incapacidad de abastecer esta demanda únicamente mediante la pesca natural, en las dos últimas décadas se ha originado tanto a nivel español, como europeo, un elevado crecimiento en la producción acuícola de esta especie (APROMAR, 2017), como queda reflejado en la figura 3. Este crecimiento ha sido motivado por el interés comercial y económico que ha ido adquiriendo esta especie a lo largo del tiempo.

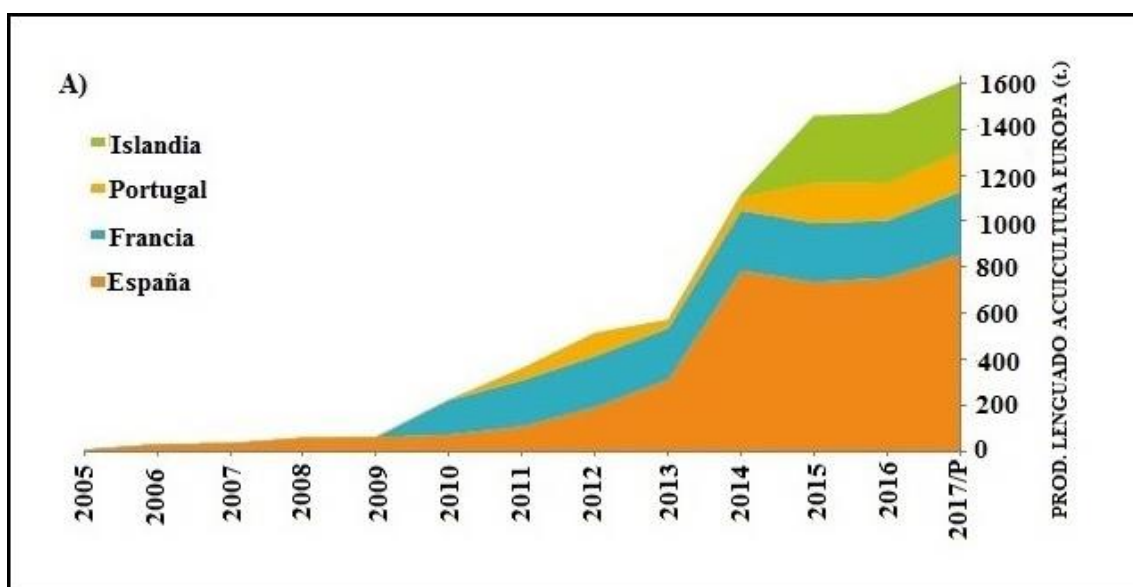


Figura 3: Evolución de la producción de *Solea senegalensis* en acuicultura desde el 2005 hasta la actualidad (APROMAR, 2017).

1.2. ENZIMAS COLINESTERASAS

Las enzimas colinesterasas son utilizadas actualmente como biomarcadores, que se emplean para determinar y evaluar los efectos producidos en los organismos, tras su exposición a agentes ambientales contaminantes. Las colinesterasas (ChEs) son un grupo de enzimas pertenecientes a las esterasas, capaces de catalizar reacciones de hidrólisis de

ésteres carboxílicos, y que se distinguen de otras esterasas por presentar una mayor afinidad a hidrolizar los ésteres de colina. Su inhibición se produce por fisostigmina (eserina) a concentraciones situadas en el rango de 10^{-5} M (Eto, 1974).

Se pueden distinguir dos tipos de colinesterasas, por un lado se encuentran la acetilcolinesterasa, y por otro, la butirilcolinesterasa. La acetilcolinesterasa (AChE), también denominada colinesterasa específica, tiene un papel muy importante en el correcto funcionamiento del sistema nervioso cerebral debido a que es la responsable de producir el impulso nervioso. En vertebrados, como los peces que ocupan nuestro estudio, se encuentra principalmente en el tejido nervioso y, en menor medida, en eritrocitos, ganglios y músculos (Sturm, Silva, Assis y Hansen, 1999). La butirilcolinesterasa (BChE), también denominada colinesterasa no específica, tiene una función fisiológica desconocida (Witter, 1963). En vertebrados se localiza principalmente en hígado, páncreas y plasma sanguíneo (Eto, 1974; Thompson y Walker 1992).

Tanto AChE como BChE se pueden distinguir por tener diferentes sustratos específicos, así como diferente sensibilidad hacia ciertos inhibidores. AChE hidroliza a alta velocidad el sustrato cuando este es acetilcolina y a menor velocidad cuando es propionilcolina o butirilcolina. Su inhibición se produce con altas concentraciones de sustrato o con BW284C51. BChE hidroliza a alta velocidad cuando el sustrato es butirilcolina y propionilcolina. No se inhibe por exceso de sustrato pero sí lo hace a bajas concentraciones de iso-OMPA (Eto, 1974).

La AChE hidroliza al neurotransmisor acetilcolina durante la sinapsis, produciendo colina y ácido acético, los precursores de sus síntesis (Figura 4). Se encuentra principalmente en las uniones neuromusculares y las sinapsis colinérgicas en el sistema nervioso central, donde su actividad sirve para terminar la transmisión sináptica. Debido a su capacidad de hidrolizar acetilcolina a nivel sináptico, estas enzimas tienen una función esencial para la transmisión del impulso nervioso tanto en el sistema nervioso central como periférico.

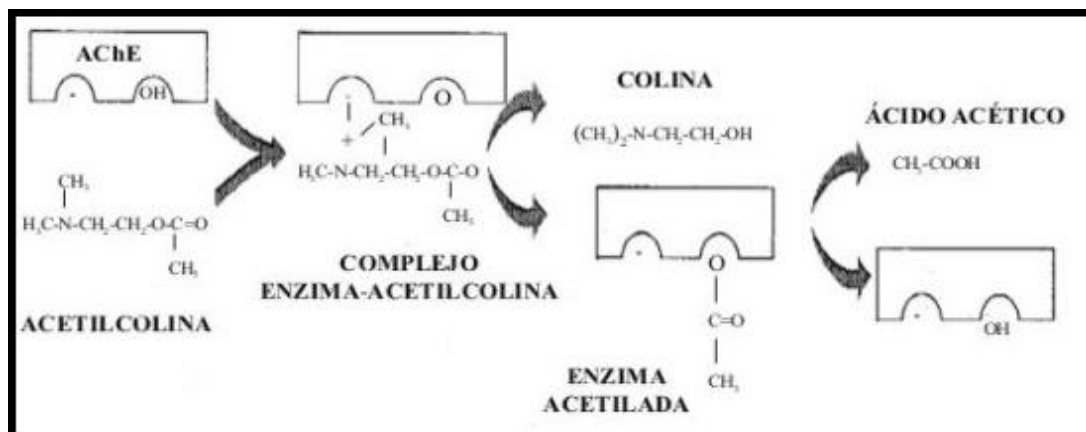


Figura 4: Hidrólisis de la acetilcolina (Jeyaratnam y Maroni, 1994).

Al inhibirse la actividad enzimática colinesterasa, se produce una acumulación excesiva de acetilcolina en el espacio intersináptico. A su vez, esto causa una hiperactividad y, en consecuencia, una parálisis del sistema neural y muscular, debido a que el impulso nervioso no se transmite correctamente. Esta alteración en el sistema nervioso, produce a los organismos anomalías en los estímulos musculares, glandulares e incluso la muerte (Jeyaratnam y Maroni, 1994).

Como consecuencia de su importancia, la inhibición de la actividad colinesterasa ha sido objeto de estudio en numerosos ensayos realizados con organismos acuáticos y distintos compuestos químicos. Magnotti, Zaino y McConnell (1994) realizaron un estudio *in vitro* utilizando extracto muscular de 28 especies de peces, obteniendo como resultado que las colinesterasas son extremadamente sensibles a los pesticidas organofosforados y carbamatos. Este mismo resultado obtuvieron Fulton y Key (2001) y Botté, Jerry, King, Smith-Keune y Negri (2012) en sus ensayos *in vivo*, realizados con ejemplares de *Acanthochromis polyacanthus* y *Cyprinodon variegatus*, *Leiostomus xanthurus*, *Micropogonias undulatus* y *Lagodon rhomboides*, respectivamente. Por tanto, estos estudios han demostrado que los pesticidas organofosforados y los carbamatos, son los principales compuestos que actúan como inhibidores de las colinesterasas, pero no son los únicos. Otros ensayos realizados con el pez cebra (Modesto y Martinez, 2012; Zomer *et al.*, 2013) indican que, aunque no este clasificado como inhibidor de la colinesterasa, el herbicida glifosato es capaz de reducir en un 50% la actividad colinesterasa en el tejido muscular de dichos peces. También, otros compuestos como detergentes, surfactantes y metales, son capaces de actuar inhibiendo la actividad

enzimática de las colinesterasas, tal y como confirmó un estudio realizado con *Poecilia reticulata* por Guilhermino, Lacerda, Nogueira y Soares (2000).

Por todo lo anteriormente expuesto, queda reflejado tanto la variedad como la cantidad de compuestos que afectan a la actividad enzimática de las colinesterasas, de donde se deduce la importancia de realizar estudios con nuevos compuestos.

1.3. ISOFLAVONAS

Las isoflavonas son compuestos difenólicos que pertenecen a la familia de los flavonoides. Están consideradas como fitoestrógenos naturales debido a que su estructura química es similar a la que presentan los estrógenos de los mamíferos. Los fitoestrógenos se pueden encontrar en frutas, vegetales, cereales y legumbres, siendo en estas últimas dónde se hallan en mayor proporción. Las isoflavonas se encuentran principalmente en la familia de las leguminosas, como en garbanzos, el trébol rojo y, sobre todo, en la soja y sus productos derivados. Algunas isoflavonas también están presentes en microorganismos (Matthies *et al.*, 2008).

Las principales y más conocidas isoflavonas son las genisteína y la daidzeína, motivo por el cual serán las estudiadas en este trabajo.

1.3.1. GENISTEÍNA

La genisteína (4',5,7-trihidroisoflavona) es, sólo por detrás de la daidzeína, la segunda más sencilla de las isoflavonas. En su estado natural se encuentra únicamente en los vegetales, principalmente en la familia *Papilionoideae* de las leguminosas. Realiza numerosas actividades biológicas, provocando efectos sobre la salud de los animales y plantas. En las plantas, la genisteína tiene efectos antimicrobianos debido a que actúa como fotoalexina y fitoanticipina. En los animales, las funciones más destacables que se le atribuyen son su acción protectora contra el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, y su acción fitoestrogénica (Dixon y Ferreira, 2002).

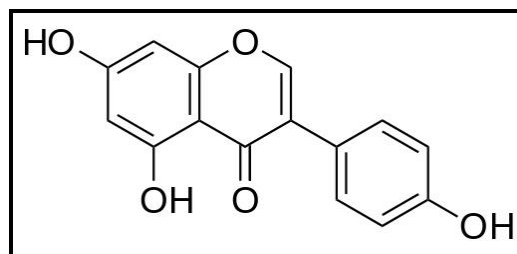


Figura 5: Estructura química de la genisteína. (Wikipedia CCL).

La estructura química de la genisteína (Figura 5), es muy similar a la del estrógeno estradiol, dándole así la capacidad de unirse a los receptores de estrógenos y a las proteínas de unión a hormonas sexuales. Esta capacidad le permite actuar como un fitoestrógeno, ejerciendo actividad tanto estrogénica como antiestrogénica. (Barnes *et al.*, 2000). Esta característica hace que la genisteína sea muy beneficiosa para las mujeres durante la menopausia ya que ayuda a contrarrestar los síntomas que esta provoca en el organismo, reduciendo el colesterol LDL en sangre, atenuando la osteoporosis o disminuyendo la posibilidad de sufrir cardiopatías (Szkudelska y Nogowski, 2007).

Por otra parte, la genisteína puede ser un agente químico con efecto preventivo contra el cáncer. Estudios realizados han demostrado que hay una menor incidencia de algunos tipos de cáncer, como de mama o de próstata, en humanos que siguen una dieta rica en alimentos que, como la soja, tienen genisteína en su composición. También, tiene el mismo efecto contra otras enfermedades de tipo crónico como la fibrosis quística, alergias o asma (Ganai y Farooqi, 2015). Este efecto también ha quedado demostrado en numerosos ensayos realizados con ratas, en las cuales se lograba inhibir el crecimiento celular y el desarrollo de tumores de mama inducidos químicamente (Fritz, Coward, Wang y Lamartiniere, 1998).

1.3.2. DAIDZEÍNA

La daidzeína (4',7-dihidroxisoflavona) es la más sencilla de las isoflavonas. Su estructura química es muy similar a la genisteína, diferenciándose únicamente en que la daidzeína tiene un grupo OH menos en su composición (Figura 6).

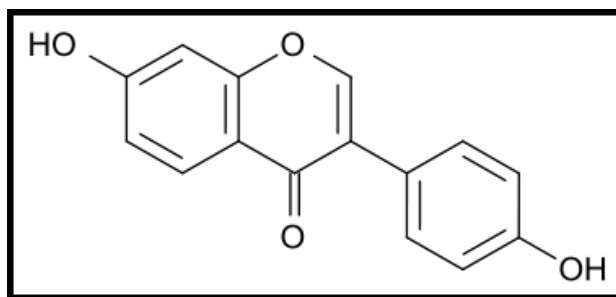


Figura 6: Estructura química de la daidzeína (Wikipedia CCL).

Al igual que ocurre con la genisteína, sólo se puede encontrar en organismos vegetales, principalmente en las leguminosas. Se diferencia de esta porque se encuentran en diferente proporción dependiendo del organismo. Por ejemplo, un gramo de proteína de soja tiene aproximadamente 150 mg de daidzeína y 250 mg de genisteína (Dixon y Ferreira, 2002).

Tiene las mismas funciones que la genisteína, tanto en vegetales como en animales, por lo que no es inusual que sean empleadas conjuntamente en ensayos realizados con isoflavonas. Una de las características específicas de la daidzeína es que puede transformarse en su metabolito final, equol, en presencia de ciertas bacterias intestinales. El equol es bioquímicamente activo, siendo así un mejor antioxidante que la daidzeína y provocando con ello beneficios positivos para la salud. Otra de sus características específicas es que la daidzeína no inhibe la actividad de la tirosina cinasa, algo que sí hace la genisteína, por lo que se emplea habitualmente como control en experimentos farmacológicos realizados con genisteína (Dixon y Ferreira, 2002).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado consiste en estudiar los posibles efectos que producen las isoflavonas en lenguados. Para ello se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la toxicidad aguda tras 96 horas de exposición a las isoflavonas, genisteína y daidzeína, en ensayos independientes realizados con juveniles de *Solea senegalensis*.

- Estudiar el efecto de las isoflavonas, genisteína y daidzeína, sobre la enzima acetilcolinesterasa presente en la cabeza de lenguado, después de 96 horas de exposición a ellas.

CAPÍTULO 3: ANTECEDENTES

La acuicultura es el cultivo de peces mediante el uso de técnicas que ayuden a obtener un mejor rendimiento (APROMAR, 2017). Debido al crecimiento anual de la población, que se estima en 9.700 millones de personas en 2050. La acuicultura constituye en la actualidad una importante fuente de alimentos, nutrición, ingresos y medios de subsistencia para cientos de millones de personas en todo el mundo. Es, por tanto, un sector que ha experimentado un importante auge durante las últimas décadas, ya que suministra al mercado la mitad de los peces destinados al consumo humano. Sostener en el tiempo este nivel de crecimiento, supone establecer un equilibrio entre el desarrollo de la actividad industrial y los impactos ambientales que causa este sector (FAO, 2016).

Uno de los retos a los que actualmente se enfrenta la acuicultura, es la necesidad de cubrir su alta demanda de piensos de calidad para alimentar a los peces. La harina de pescado es, por su alto valor nutricional, la base de estos piensos, pero debido a su alta demanda, cada vez es menos sostenible económica y ambientalmente su utilización para estos fines. Esto ha motivado que se busquen nuevas alternativas a esta materia prima, comenzándose a sustituir por otras harinas vegetales, principalmente la harina de soja, por su alta calidad nutricional y bajo coste (FAO, 2012). Sin embargo, la presencia de harina de soja en la composición del pienso, puede producir efectos no deseados en los peces, al incluir en su alimentación las altas concentraciones de isoflavonas que se encuentran de forma natural en esta leguminosa.

Para llegar a comprender la importancia actual de introducir estos compuestos en la alimentación de los peces, se ha realizado una revisión bibliográfica. Durante dicha revisión bibliográfica, se observó que las isoflavonas genisteína y daidzeína han sido objeto de numerosos estudios (ANEXO) a lo largo de los últimos años (Kaufman, Duke, Brielmann, Boik y Hoyt, 1997; Dixon y Ferreira, 2002; Howes, Howes y Knight, 2006) debido a las propiedades que presentan y a los efectos que pueden causar sobre los diferentes organismos.

Como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que dosis bajas de estos compuestos, pueden aportar muchos beneficios a la salud humana, debido a que ejercen actividad preventiva contra el cáncer y enfermedades cardiovasculares, reducen los trastornos derivados de la menopausia y mejoran las defensas del sistema inmunológico (Dixon y Ferreira, 2002).

Por el contrario, se ha observado que estas mismas dosis causan efectos tóxicos en diferentes especies de peces. La inclusión de genisteína y daidzeína en la dieta, ha demostrado tener la capacidad de alterar el crecimiento y, principalmente, el sistema hormonal y los procesos endocrinos de los peces (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001; DiMaggio, Kenter, Breton y Berlinsky, 2014).

Su capacidad para provocar alteraciones en los organismos acuáticos, se ha estudiado en profundidad tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*. Ensayos *in vivo* realizados por Rathinasamy *et al.* (2014) tuvieron como resultado que la exposición a distintas concentraciones, incluidas las muy bajas, de isoflavonas inhibe la regeneración de la aleta caudal en los peces cebra (*Danio rerio*). Otros estudios realizados con estos compuestos, indicaron que en altas concentraciones pueden llegar a provocar la apoptosis, o muerte celular programada, del cerebro y la médula espinal en embriones de peces (Kim *et al.*, 2009; Sassi-Messai *et al.*, 2009). Además, se demostró que causan alteraciones en la diferenciación sexual de los individuos, afectando a la reproducción de diversas especies de peces, debido la actividad estrogénica o antiestrogénica que presentan (Kiparissis, Balch, Metcalfe y Metcalfe, 2003; Schiller *et al.*, 2013). En ensayos *in vitro* realizados con órganos, riñón e hígado, de distintas especies de peces, como el salmón (*Salmo salar*) o la trucha (*Salvelinus namaycush*), se ha obtenido como resultado que la exposición a diferentes dosis de isoflavonas detiene la actividad metabólica de dichos órganos (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 4: MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICOS

En la realización de este estudio se utilizaron juveniles de la especie *Solea senegalensis* que fueron suministrados por el Servicio de Cultivos Marinos de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz con número de registro

CA/3/U en la Sección de Establecimiento Usuario y CA/3/CS en la Sección de Establecimiento de Cría y Suministro de Animales de Experimentación de la Comunidad Autónoma de Andalucía.

Los protocolos de experimentación de este trabajo fueron realizados respetando la legislación actual referente a la experimentación animal. Esta legislación incluye la Directiva 2010/63/UE y el Real Decreto 53/2013, relativos ambos a la protección y al correcto tratamiento de animales utilizados en experimentación.

Los peces que se emplearon en estos ensayos fueron conservados en el Servicio de Cultivos Marinos en unas condiciones controladas de entre 18 y 19 ° C de temperatura, 38 g/l de salinidad y foto-periodo natural.

4.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD

Un ensayo de toxicidad tiene como finalidad establecer y evaluar los efectos que produce una determinada sustancia en un organismo. Estos ensayos consisten en exponer, en condiciones controladas y durante un tiempo determinado, los organismos a concentraciones crecientes de la sustancia tóxica y ver los efectos que ésta les provoca. Esto nos permite estudiar la relación dosis – respuesta que se produce entre la cantidad de sustancia tóxica y la magnitud del efecto.

Para este trabajo se realizaron dos ensayos semiestáticos de toxicidad aguda, uno utilizando genisteína y el otro con daidzeína, en los que ejemplares juveniles de *Solea senegalensis* fueron expuestos a diferentes concentraciones de los compuestos durante 96 horas. En cada ensayo, se utilizaron 63 ejemplares con una talla de $4,65 \pm 0,57$ cm y un peso de $0,36 \pm 0,05$ g.

Los ensayos se realizaron en las instalaciones del Servicio de Cultivos Marinos. En cada uno de los ensayos fueron utilizados veintiún tanques de vidrio con un volumen de un 1 L de agua de mar, cinco concentraciones, un control con agua de mar y otro con dimetilsulfóxido (DMSO). Las cinco concentraciones fueron disueltas en DMSO debido a la baja solubilidad de los compuestos estudiados en agua. Se realizaron tres réplicas de cada concentración así como de ambos controles (Figura 7).

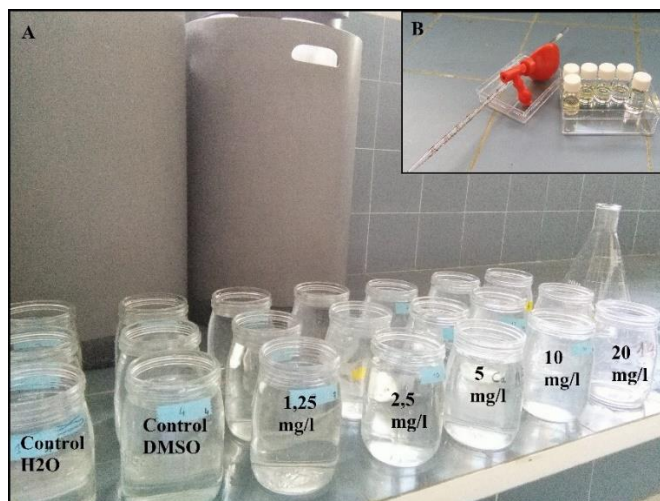


Figura 7. Ensayo con genisteína. A: Tanques utilizados en el ensayo. B: Concentraciones de genisteína. (Aranda, 2017).

Las concentraciones de genisteína y daidzeína fueron elegidas tras realizar una revisión bibliográfica. En el caso de la genisteína las concentraciones elegidas fueron: 1,25 mg/l, 2,5 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l y 20 mg/l. Mientras que para la daidzeína fueron: 0,625 mg/l, 1,25 mg/l, 2,5 mg/l, 5 mg/l y 10 mg/l. Las diferencias en las concentraciones se deben a la menor solubilidad de la daidzeína en DMSO, lo que hizo necesario utilizar concentraciones más bajas de esta sustancia.

En cada tanque fueron introducidos tres ejemplares juveniles de *Solea senegalensis*. A su vez, estos tanques se introdujeron en cubetas por las que circulaba agua de mar con el fin de mantener la temperatura constante. Además, se instalaron sistemas de aireación para garantizar una correcta oxigenación del agua durante los ensayos. (Figura 8. A). La duración de estos fue de 96 horas y se realizaba una renovación del agua y de las disoluciones cada 24 horas.

En ambos ensayos, se midieron cada 24 horas los siguientes parámetros físico-químicos en un tanque de cada concentración: pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura. Esto fue realizado para controlar las condiciones y la calidad del agua donde se encontraban los peces.

Las medidas fueron tomadas tanto antes de proceder a la renovación del agua (agua con 24 horas) como inmediatamente después de renovarla (agua con 0 horas). La toma de medidas se realizó introduciendo directamente la sonda multiparamétrica (HANNA HI 9829), tras ser calibrada, en los tanques de los ensayos de los cuales los peces fueron previamente retirados (Figura 8. B).

Una vez transcurridas 96 horas, los peces fueron anestesiados por inmersión en una mezcla de metanosulfonato de tricáina y bicarbonato sódico, 0,1 y 0,3 g/L, respectivamente. Estando anestesiados, se tomaron medidas de su longitud y peso (Figura 8. C y D). Después, se sacrificaron por decapitación. Finalmente, las muestras de cabeza y cuerpo fueron pesadas y congeladas individualmente a - 80 ° C hasta el momento de su tratamiento.

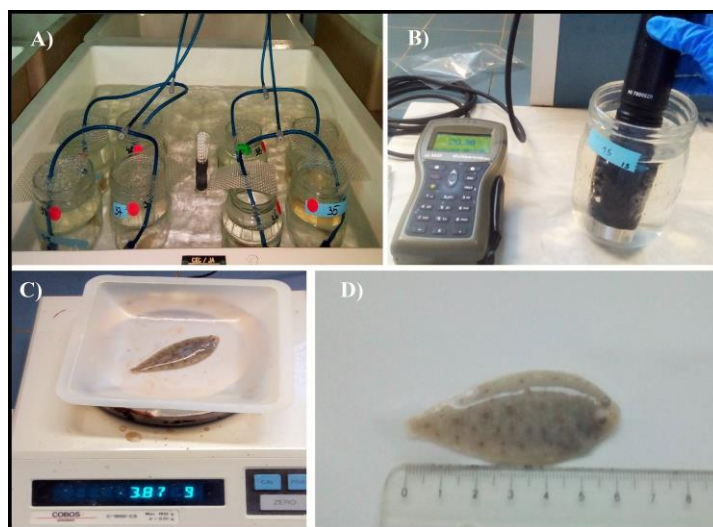


Figura 8. A) Tanques con los peces en la cubeta con circulación de agua. B) Toma de medidas de los diferentes parámetros físico-químicos del agua. C) Pesaje de los lenguados. D) Tallaje de los lenguados (Aranda, 2017).

4.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de cabeza recogidas en los ensayos de toxicidad previos fueron homogeneizadas. Dicha homogeneización se realizó en hielo con un homogeneizador de alta velocidad Ultra-Turrax (Schott Ibérica, España) durante 3 minutos, a razón de 20 mg de la muestra en 1 ml de tampón fosfato 0,1 M de pH 7,4. Después, el homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm (9000 x g) durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Tras el centrifugado, el pellet obtenido se descartó y el sobrenadante se conservó en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente, estos fueron congelados a - 80° C hasta el momento de su análisis.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA

La actividad colinesterasa presente en la cabeza de los juveniles de *Solea senegalensis* se obtuvo aplicando el método de Ellman (1961), modificado para microplacas por Guilhermino *et al.* (1996). Esta actividad fue medida utilizando microplacas con 96 pocillos es los que se añadieron 45 μ l de la muestra homogeneizada, 5 μ l de inhibidor iso-OMPA y 250 μ l de una mezcla de reacción que contenía el reactivo de Ellman (DTNB). La mezcla de reacción se preparó añadiendo 30 ml de tampón fosfato 0,1 M de pH 7,4, 1 ml de ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) y 200 μ l de acetiltiocolina (ASCh) 200 mM disuelta en agua ultrapura milli-Q. Las concentraciones finales de los pocillos fueron: sustrato (ASCh) 1,07 mM y DTNB 0,27 mM.

Se utilizó el inhibidor iso-OMPA por ser el específico de la butirilcolinesterasa. Al emplear el tejido de la cabeza de los lenguados, la acetilcolinesterasa es la que se encuentra en mayor proporción, siendo por tanto la elegida para realizar este estudio (Corrales, 2016).

En estos ensayos se incubaron 45 μ l de la muestra homogeneizada con 5 μ l de la disolución de inhibidor (10^{-3} M). Una vez transcurridos 30 min, se añadieron los 250 μ l de la mezcla de reacción e inmediatamente después, la velocidad de reacción enzimática fue determinada utilizando un lector de microplacas Bio-Rad, modelo Mark Plus, midiendo la absorbancia a 415 nm durante 3 minutos cada 30 segundos. En los controles, la incubación se realizó con 5 μ l de agua milli-Q. Cada muestra y control se midió por triplicado en todos los casos. La absorbancia se debe a la acción del 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) formado por la reacción que se produce y que fue descrita por Ellman *et al.* (1961) como se representa en la figura 9.

La actividad específica se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} &\text{Actividad específica (nmol min}^{-1}\text{mg proteína)} \\ &= \frac{\text{Actividad enzimática (nmol min}^{-1}\text{ml}^{-1})}{\text{Concentración de proteínas (mg ml}^{-1})} \end{aligned}$$

4.5. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976) adaptado a microplacas (método estándar de BioRad), utilizando para ello Albúmina Sérica Bovina (BSA) como estándar. Este método se fundamenta en la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con las proteínas.

En la realización de estos ensayos fueron utilizadas microplacas de 96 pocillos en los que se añadieron 10 μ l de muestra o de patrón de proteínas (0, 0,0625, 0,125, 0,25 y 0,5 mg/ml de BSA) y 200 μ l de reactivo de Bradford. Para preparar el reactivo fueron mezcladas una parte del reactivo comercial concentrado con cuatro partes de agua ultrapura milli-Q. Se dejó reaccionar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm de cada una de las muestras por triplicado.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos de actividad colinesterasa que se obtuvieron en los diferentes ensayos realizados fueron tratados con varios programas informáticos. En primer lugar los datos se organizaron y presentaron en una hoja de cálculo EXCEL 2013 y después se realizó un análisis estadístico de los mismos utilizando el programa SPSS para Windows versión 23.

El análisis estadístico consistió en comprobar la normalidad de los datos aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov y su homogeneidad a través el test de Bartlett. Estas hipótesis fueron aceptadas cuando el nivel de significación fue de $p \leq 0,05$. A continuación, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para comprobar la existencia de diferencias significativas, aceptando para ello el mismo nivel de significación anterior.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en los ensayos realizados con genisteína y daidzeína, que han sido descritos anteriormente en el Capítulo 4. Los ensayos de toxicidad fueron realizados para estudiar y evaluar los posibles efectos de estas isoflavonas sobre los juveniles de *Solea senegalensis*, tras una exposición de 96 horas y sobre la actividad de las enzimas acetilcolinesterasas presentes en la cabeza de estos.

5.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD CON GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA

Durante la realización de los ensayos con ambos compuestos, se midieron los parámetros de pH, oxígeno disuelto, salinidad/conductividad y temperatura en uno de los tanques utilizados para cada concentración, siendo muy importante controlar estos parámetros para evitar que pudieran tener un efecto sobre los juveniles de lenguado que ocultara el efecto de la genisteína o daidzeína (dependiendo del ensayo). Los valores obtenidos para todos los parámetros, se encontraban dentro de los rangos considerados óptimos para asegurar el buen estado de los peces.

En el transcurso de las 96 horas de duración de ambos ensayos de toxicidad, se llevó a cabo un control diario de manera visual de los individuos, para determinar si la exposición de estos, a las diferentes concentraciones disueltas en agua de los compuestos estudiados, les causaba algún tipo de efecto.

No se registró ningún tipo de cambio, ni físico ni de comportamiento en los individuos, así como tampoco se produjo mortalidad para ninguna de las concentraciones utilizadas en ambos ensayos.

5.2. EFECTO DE LA GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA SOBRE LA ACETILCOLINESTERASA PRESENTE EN LA CABEZA DE *Solea senegalensis*

En los estudios posteriores a los ensayos *in vivo*, se realizó la determinación de la actividad enzimática acetilcolinesterasa presente en la cabeza de los individuos de *Solea senegalensis*, tras 96 horas de exposición a las distintas concentraciones de genisteína o daidzeína.

Los resultados obtenidos en el ensayo realizado con genisteína, se muestran en la figura 10. Tal como se muestra en dicha figura, no se aprecian diferencias

estadísticamente significativas entre los controles y las diferentes concentraciones de genisteína utilizadas en este estudio.

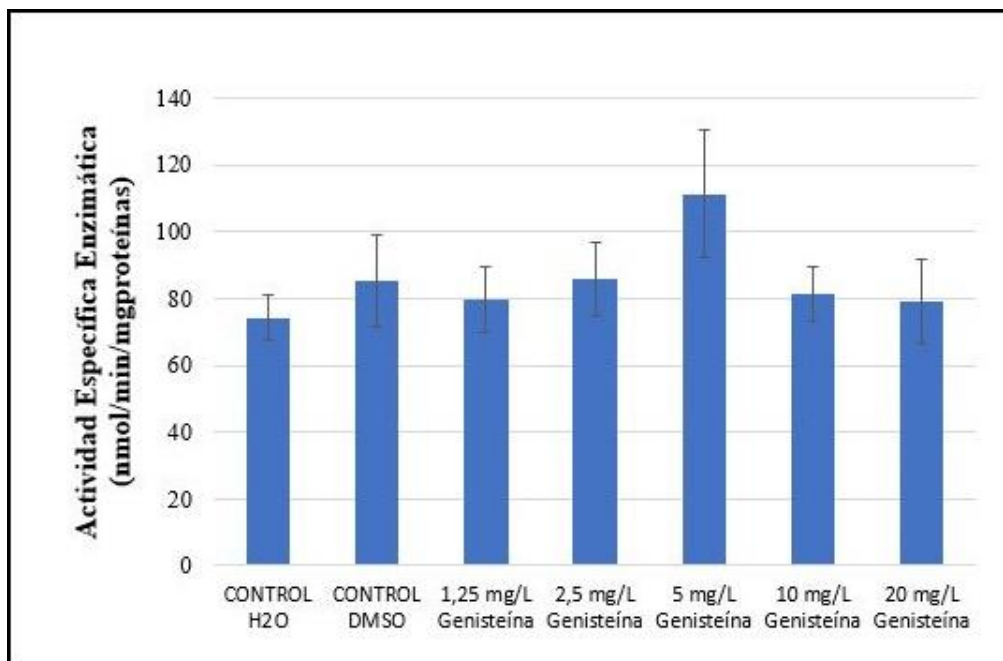


Figura 10: Actividad colinesterasa obtenida, en presencia del inhibidor iso-OMPA, tras su exposición de 96 horas a distintas concentraciones de genisteína. Las barras representan la media de las tres réplicas de cada uno de los 9 ejemplares expuestos en cada concentración con sus correspondientes barras de error estándar de la media.

En el caso de la daidzeína, los resultados obtenidos se muestran en la figura 11. En esta figura, se puede observar como existe una mayor variabilidad, entre los valores obtenidos en los ensayos con respecto a los controles. Las concentraciones menores a 2,5 mg/l de daidzeína, presentan valores de actividad colinesterásica similares o menores a los obtenidos en los controles, mientras que las concentraciones mayores muestran un incremento en esta actividad enzimática. Sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los controles y las distintas concentraciones probadas de daidzeína.

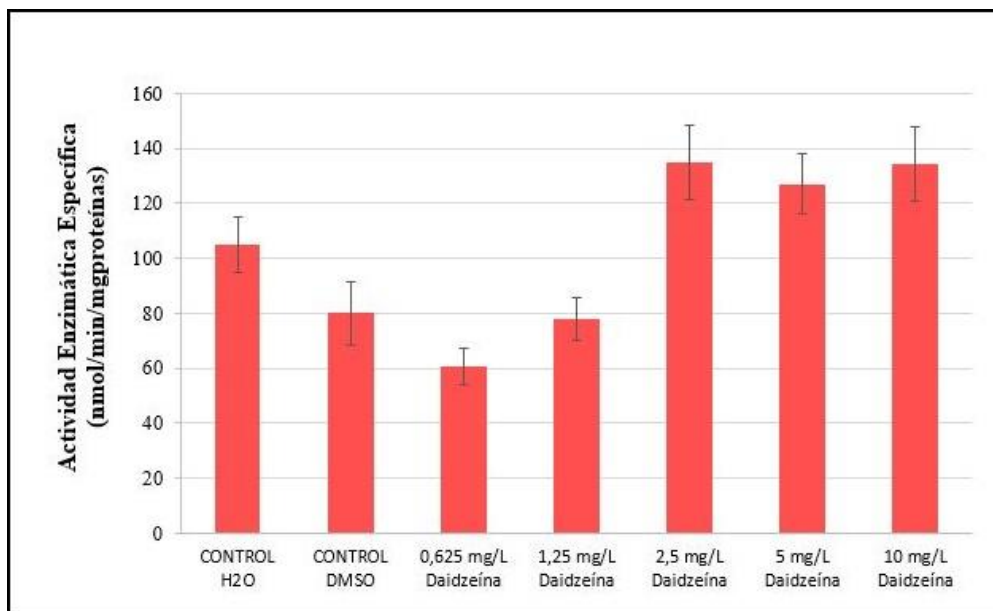


Figura 11: Actividad colinesterasa obtenida, en presencia del inhibidor iso-OMPA, tras su exposición de 96 horas a distintas concentraciones de daidzeína. Las barras representan la media de las tres réplicas de cada uno de los 9 ejemplares expuestos en cada concentración con sus correspondientes barras de error estándar de la media.

CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN

A la vista de los resultados expuestos en el Capítulo 5, se puede afirmar que la genisteína y la daidzeína no provocan efectos significativos en los ejemplares juveniles de *Solea senegalensis* que fueron expuestos durante 96 horas a diferentes concentraciones de estos compuestos por separado.

De los ensayos semiestáticos de toxicidad aguda realizados, no ha podido obtenerse un valor para la CL_{50} , siendo esta, un parámetro que se emplea para determinar la concentración de un compuesto que resulta letal para el 50% de una población de organismos expuestos a este. Dado que, después de exponer a los lenguados durante 96 horas, frente al compuesto genisteína, no se produjo la muerte de ninguno de los ejemplares de *Solea senegalensis*, inclusive en los expuestos a mayores concentraciones. Además, mediante la realización del control visual diario de los individuos que se llevó a cabo durante todo el ensayo, no se observaron ni cambios de comportamiento ni físicos en ellos, por lo que se puede afirmar que no les afectó en estos aspectos. En lo referente a la daidzeína, tampoco se pudo establecer un valor para la CL_{50} , debido a que no se registró mortalidad en ninguna de las concentraciones utilizadas. De la misma manera, en el control visual realizado diariamente, nunca se detectó ningún comportamiento

anómalo. Debido a que únicamente se realizó un seguimiento visual de los individuos durante estos ensayos, sería conveniente realizar estudios *in vitro* a posteriori con el tejido corporal de los peces, para comprobar si existen daños causados por esta isoflavona a nivel orgánico. En estudios realizados por Sassi-Messai *et al.* (2009) con peces cebras (*Danio rerio*), se demostró que la genisteína causa la muerte celular durante el desarrollo embionario de los peces. Además, la genisteína puede afectar al desarrollo físico tal y como se demostró por Ingham, Gesualdi, Toth y Clotelte (2004), en sus estudios realizados con *Pimephales promelas*, que la exposición durante un tiempo prolongado de estos a altas dosis de genisteína, les provocaba una disminución en el ritmo natural de crecimiento. También, un ensayo realizado con trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en el cual se estudió el efecto de la daidzeína y genisteína conjuntamente, determinó que estos compuestos afectan la expresión de genes en la trucha arco iris que regulan los mecanismos fisiológicos centrales para el crecimiento y la retención de nutrientes (Cleveland y Manor, 2015).

Por otra parte, en base a los resultados obtenidos, puede afirmarse que el efecto que produce la genisteína sobre las enzimas acetilcolinesterasas, presentes en la cabeza de los juveniles de lenguado no es relevante, debido a que no se ha registrado ninguna diferencia significativa entre las medidas de actividad acetilcolinesterasa obtenidas para los grupos control y los grupos de individuos expuestos a las diferentes concentraciones de este compuesto. Del mismo modo, el efecto que la daidzeína ha demostrado tener sobre las enzimas acetilcolinesterasas ha resultado ser nulo, puesto que tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos control y los grupos expuestos a las diferentes concentraciones de este compuesto.

Tras la revisión bibliográfica, no se han encontrado estudios realizados con peces que se hayan dedicado en exclusiva a estudiar el efecto que causa la daidzeína en la actividad acetilcolinesterasa, ya que debido a su gran similitud con la genisteína, ambos compuestos suelen utilizarse de forma conjunta en los ensayos realizados y no por separado. No obstante, existen estudios realizados *in vitro*, en los cuales se estudió la actividad acetilcolinesterasa presente en la corteza cerebral de ratas, que obtuvieron como resultado que la mayoría de compuestos derivados de la genisteína, presentan una notable capacidad inhibidora de acetilcolinesterasa (Fang *et al.*, 2014; Quiag *et al.*, 2014). A pesar de estos estudios, que apuntan a la inhibición de las colinesterasas tras la exposición a la genisteína y sus compuestos derivados, estudios *in vivo* realizados con peces por este

grupo de investigación, han obtenido que esta inhibición a la que apunta la bibliografía no se produce. Además del presente trabajo, existe un ensayo anterior realizado por el mismo grupo (Corrales, 2016), en el cual también se estudia el efecto de la genisteína en las colinesterasas presentes en la cabeza de individuos juveniles de *Solea solea*. Comparando los resultados de ambos estudios, se observa que los valores obtenidos con las dos especies de la familia *Solea*, son muy similares para las mismas concentraciones, no existiendo en ninguno de ellos, diferencias significativas que muestren ningún efecto de la genisteína sobre la actividad enzimática.

Finalmente, sería de interés seguir realizando estudios sobre el efecto de estos compuestos, tanto en el lenguado como en otras especies de peces, haciendo especial hincapié en el caso de la daidzeína, debido a la falta de estudio que presenta en la actualidad. Deberían además incluirse, metodologías que analicen parámetros que no han sido objeto de estudio en el presente trabajo, como puede ser el crecimiento o la reproducción de los individuos expuestos a las isoflavonas utilizadas en este trabajo. Así mismo, sería conveniente estudiar su efecto en diferentes etapas del desarrollo de los peces, como la fase embrionaria, el estado larvario o la metamorfosis, debido a que son durante estas cuando el pez es más sensible a los contaminantes.

CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados que se han obtenido en este Trabajo de Fin de Grado, se enumeran las siguientes conclusiones:

- Los ensayos de toxicidad aguda realizados con las isoflavonas, genisteína y daidzeína, no registraron mortalidad ni cambios físicos ni de comportamiento en los juveniles de *Solea senegalensis* para las concentraciones utilizadas.
- No se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática acetilcolinesterasa entre los individuos control y los individuos expuestos a ambas isoflavonas.

CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA

- APROMAR. (2017). La acuicultura en España 2017. Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR). España. 93 pp.
- Barnes, S., Kim, H., DarleyUsmar, V., Patel, R., Xu, J., Boersma, B., & Luo, M. (2000). Beyond ER alpha and ER beta: estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *The Journal of nutrition*. 130, 656. S-657S.
- Bennetau-Pelissero, C., Breton B, B., Bennetau, B., Corraze, G., Le Menn, F., Davail-Cuisset, B., Helou & Kaushik, S. J. (2001). Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 121(2), 173–187. <https://doi.org/10.1006/gcen.2000.7585>
- Botté, E. S., Jerry, D. R., King, S. C., Smith-keune, C., & Negri, A. P. (2012). Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*, 65, *Marine Pollution Bulletin* 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.020>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cañavate, J P. (2005). “Opciones Del Lenguado Senegalés *Solea Senegalensis* Kaup, 1858 Para Diversificar La Acuicultura Marina.” *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 21: 147–54. <http://doi.org/10.1111/raq.12091>
- Cañavate, J. P. (2013). Capítulo 6: Cultivo de soleidos: El lenguado senegalés. Diversificación de especies en la piscicultura marina española. 243-272. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. [http://doi.org/10.1016/S0141-1136\(98\)00127-5](http://doi.org/10.1016/S0141-1136(98)00127-5)
- Corrales Reyes, A (2016). Toxicidad de la isoflavona genisteína en juveniles de *Solea solea*. Trabajo de fin grado. Universidad de Cádiz.
- Cleveland, B. M., & Manor, M. L. (2015). Effects of phytoestrogens on growth-related and lipogenic genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative*

- Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 170, 28–37.
<http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.02.001>
- Desoutter, M., (1990). Soleidae. p. 1037-1049. In J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.) Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2.
- Dimaggio, M. A., Kenter, L. W., Breton, T. S., & Berlinsky, D. L. (2016). Effects of dietary genistein administration on growth, survival and sex determination in southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Aquaculture Research*, 47(1), 82–90.
<https://doi.org/10.1111/are.12470>
- Dinis, M.T., (1986). Quatre Soleidae de l'Estuaire du Tage. Reproduction et Croissance. Essai d'Elevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. These d'Etat es-Sciences Naturelles, Universite de Bretagne Occidentale, France.
- Dixon, R. A., & Ferreira, D. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, 60(3), 205–211.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00116-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00116-4)
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Eto, M. (1974). *Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry* (Ohio: CRC Press, Inc.).
- Fang, J., Wu, P., Yang, R., Gao, L., Li, C., Wang, D., & Du, G. H. (2014). Inhibition of acetylcholinesterase by two genistein derivatives: kinetic analysis, molecular docking and molecular dynamics simulation. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 4(6), 430–7. <http://doi.org/10.1016/j.apsb.2014.10.002>
- FAO. (2012). *Alimentar Al Sector De La Acuicultura En Crecimiento: Un Análisis*. Consultado 2 de diciembre en <http://www.fao.org/3/a-mc825s.pdf>
- FAO, F. & A. O. of the U. N. (2016). *Contributing to food securit and nutrition for all. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016.*, 24.
- FAO Fisheries & Aquaculture - Species Fact Sheets. (2017). *Fao.org*. Consultado el 30 de julio de 2017, en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Solea_spp/en

- Fritz, W. A., Coward, L., Wang, J., & Lamartiniere, C. A. (1998). Dietary genistein : perinatal mammary cancer prevention , bioavailability and toxicity testing in the rat, *Carcinogenesis* 19(12), 2151–2158.
- Fulton, M. H., & Key, P. B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 20(1), 37–45. <http://doi.org/10.1002/etc.5620200104>
- Ganai, A. A., & Farooqi, H. (2015). ScienceDirect Bioactivity of genistein : A review of in vitro and in vivo studies. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 76, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.10.026>
- Guilhermino, L., Lacerda, M. N., Nogueira, A. J. A., Soares, A. M. V. M., & Martinez-tabche, M. Ž. (2000). In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents : possible implications for contamination biomonitoring. *Science of the Total Environment*, 247(2-3), 137-141. [http://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00485-4](http://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00485-4)
- Howes, L. G., Howes, J. B., & Knight, D. C. (2006). Isoflavone therapy for menopausal flushes: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas*, 55(3), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2006.03.008>
- Ingham RR, Gesualdi DA, Toth CR, & Clotfelte ED (2004). Effects of genistein on growth and development of aquatic vertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 625–631. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0289-0>
- Jeyaratnam, J., & Maroni, M. (1994). Organophosphorus compounds. *Toxicology* 91, 15-27. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(94\)90236-4](https://doi.org/10.1016/0300-483X(94)90236-4)
- Kaufman, P. B., Duke, J. a, Brielmann, H., Boik, J., & Hoyt, J. E. (1997). A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* (New York, N.Y.), 3(1), 7–12. <https://doi.org/10.1089/acm.1997.3.7>
- Kim, D. J., Seok, S. H., Baek, M. W., Lee, H. Y., Na, Y. R., Park, S. H. & Park, J.H. (2009). Developmental toxicity and brain aromatase induction by high genistein

- concentrations in zebrafish embryos. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 19(3), 251–256. <http://doi.org/10.1080/15376510802563330>
- Kiparissis, Y., Balch, G. C., Metcalfe, T. L., & Metcalfe, C. D. (2003). Effects of the isoflavones genistein and equol on the gonadal development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives*, 111(9), 1158–1163. <https://doi.org/10.1289/ehp.5928>
- Klaren, P. H. M., Wunderink, Y. S., Yúfera, M., Mancera, J. M., & Flik, G. (2008). The thyroid gland and thyroid hormones in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) during early development and metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, 155(3), 686–694. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.09.014>
- Magnotti, R. A., Zaino, J. P., & McConnell, R. S. (1994). Pesticide-sensitive fish muscle cholinesterases. Pergamon, 0742-8413(94) E0004-S
- MAPAMA. (2017). Consultado el 30 de julio de 2017. http://www.mapama.gob.es/app/jacumar/planes_nacionales/Documentos/78_IF_LENGUADO_I.PDF
- Matthies, A., Clavel, T., Gütschow, M., Engst, W., Haller, D., Blaut, M., & Braune, A. (2008). Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine. *Appl Environ Microbiol* 74, 4847–4852. <http://doi.org/10.1128/AEM.00555-08>
- Modesto, K. A., & Martinez, C. B. R. (2010). Chemosphere Effects of Roundup Transorb on fish : Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81(6), 781–787. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005>
- Ng, Y., Hanson, S., Malison, J. A., Wentworth, B., & Barry, T. P. (2006). Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. *Aquaculture*, 254(1–4), 658–665. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.039>
- Qiang, X., Sang, Z., Yuan, W., Li, Y., Liu, Q., Bai, P., ... Deng, Y. (2014). European Journal of Medicinal Chemistry Design , synthesis and evaluation of genistein- O -alkylbenzylamines as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer ' s disease, 76, 314–331.

- Rathinasamy, V. S., Paneerselvan, N., & Ragunathan, M. (2014). Effect of genistein on regenerative angiogenesis using zebrafish as model organism. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 4(4), 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.07.002>
- Rodríguez Villanueva, J.L. & Peleteiro, J.B. (2014). Cultivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). 47 pp. Cuadernos de Acuicultura nº 7. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid, Spain.
- Sanches, J.G., (1991). Catálogo dos principais peixes marinhos da República de Guiné-Bissau. Publ. Avuls. Inst. Nac. Invest. Pescas 16:429 p.
- Sassi-Messai, S., Gibert, Y., Bernard, L., Nishio, S.-I., Ferri Lagneau, K. F., Molina, J. & Laudet, V. (2009). The phytoestrogen genistein affects zebrafish development through two different pathways. *PloS One*, 4(3), e4935. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0004935>
- Schiller, V., Wichmann, A., Kriehuber, R., Muth-Köhne, E., Giesy, J. P., Hecker, M., & Fenske, M. (2013). Studying the effects of genistein on gene expression of fish embryos as an alternative testing approach for endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 157(1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.09.005>
- Sturm, A., Silva, H. C., Assis, D., & Hansen, P. (1999). Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination, 47, 389–398. [http://doi.org/10.1016/S0141-1136\(98\)00127-5](http://doi.org/10.1016/S0141-1136(98)00127-5)
- Szkudelska, K., & Nogowski, L. (2007). Genistein-A dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 105(1–5), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.01.005>
- Torres, Armi G. & Ueberschaer, Bernd. (2017). FishBase. Consultado el 2 de diciembre de 2017. <http://fishbase.org/summary/Solea-senegalensis.html>
- Thompson, H. & Walker, C. (1992), Blood esterases as indicators of exposure to organophosphorus and carbamate insecticides. In *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, M.C. Fossi and C. Leonzio, eds (Boca Raton: Lewis Publishers), pp. 37–62.

- Witter, R. F. (1963), Measurement of blood cholinesterase. Archives of Environmental Health, 6, 99–125.
- Zomer, J., Coimbra, R., Moreira, F., Francisco, H., Marques, M., Martinez, C. De, Eduardo, C. (2013). Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata* : In vitro studies. Aquatic Toxicology, 130–131, 171–173.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.006>

ANEXO

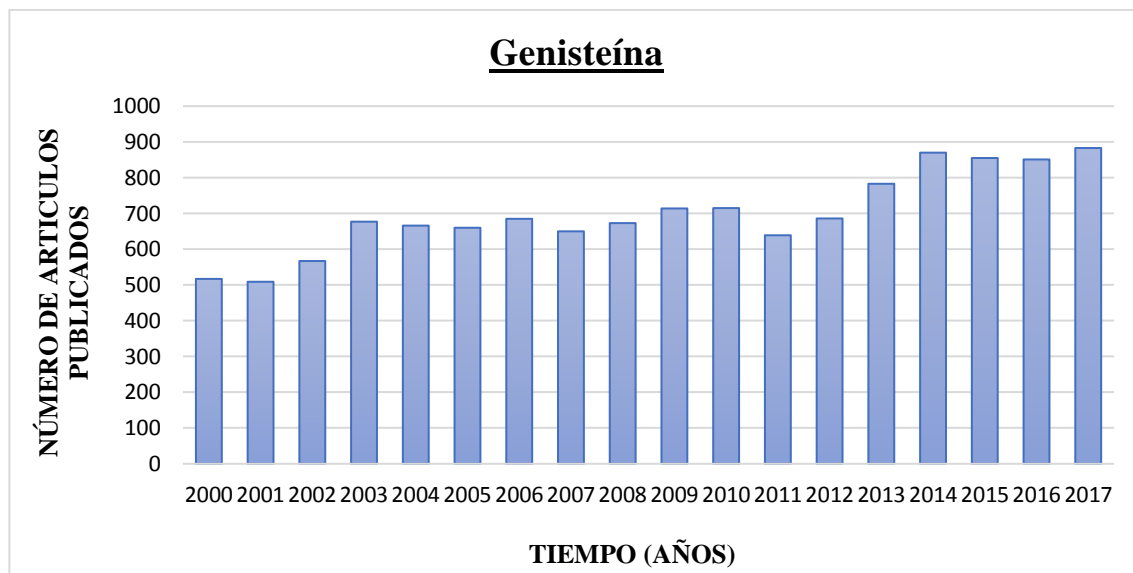


Figura 12: Número de artículos publicados en los cuales el objeto de estudio es el efecto de la genisteína, durante el periodo 2000-2017. Elaborada con datos obtenidos en www.sciencedirect.com

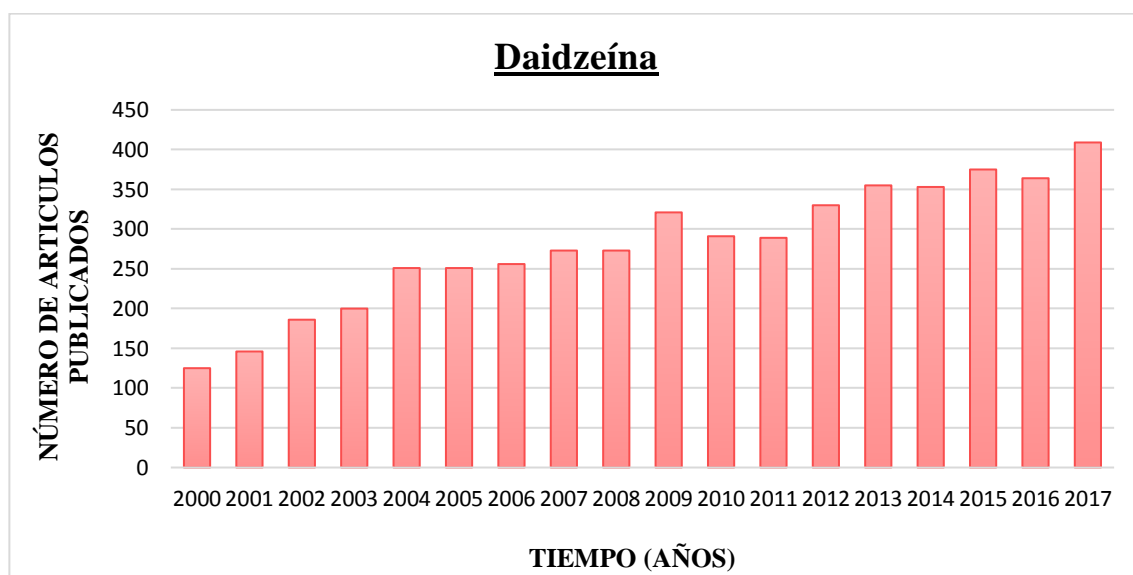


Figura 13: Número de artículos publicados en los cuales el objeto de estudio es el efecto de la daizeína, durante el periodo 2000-2017. Elaborada con datos obtenidos en www.sciencedirect.com